24 med

Aus der Neurologischen Klinik Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Janzen

Papier- und Agar-Gel-Elektrophoretische Untersuchungen der Proteine in Gehirnpreßsäften

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Leonhard Diekmann
aus Lohne

Hamburg 1961

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Neurologischen Klinik Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Janzen

Papier- und Agar-Gel-Elektrophoretische Untersuchungen der Proteine in Gehirnpreßsäften

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Leonhard Diekmann
aus Lohne

Hamburg 1961

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27. 6. 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. R. Prévôt
Referent: Professor Dr. Bauer
Korreferent: Professor Dr. Dr. Janzen

Aus der Neurologischen Klinik Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Janzen

Papier- und Agar-Gel-Elektrophoretische Untersuchungen der Proteine in Gehirnpreßsäften

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Leonhard Diekmann
aus Lohne

Hamburg 1961

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27. 6. 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. R. Prévôt
Referent: Professor Dr. Bauer
Korreferent: Professor Dr. Dr. Janzen

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Herrn Dozenten Dr. H. Bauer danke ich
für die Überlassung des Themas und für
jeder Zeit bereitwillige Hilfe.

Inhaltsverzeichnis

		Seite:
A.	Einleitung.	1
B.	Rückblick auf die Verfahren, Gewebeproteine zu extrahieren.	1
C.	Eigene Untersuchungen mit der Veronal-extraktion.	3
D.	Material und seine Aufarbeitung.	5
E.	Methodik der Papierelektrophorese.	7
F.	Methodik der Elektrophorese in Agar-Gel.	7
G.	Ergebnisse der Papierelektrophorese.	10
H.	Ergebnisse der Elektrophorese in Agar-Gel.	13
I.	Reproduzierbarkeitsuntersuchungen.	23
J.	Diskussion.	27
K.	Zusammenfassung.	37
L.	Literatur.	39
M.	Lebenslauf.	41

A. Einleitung.

Während das qualitative Verhalten und die klinische Bedeutung der Serum- und Liquorproteine in elektrophoretischen Analysen eingehend bearbeitet wurden, stehen Untersuchungen über die Eiweißzusammensetzung der Gewebe noch in den Anfängen. Die Empfindlichkeit der Proteine gegen Autolyse, ihre enge Koppelung an Lipide, die Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels, die kleinen Eiweißmengen in dem gewonnenen Extrakt, sowie die chemisch-physikalische Wechselwirkung zwischen Trägermedium und Vehikel sind die wichtigsten Erschwernisse bei der elektrophoretischen Darstellung.

B. Rückblick auf die Verfahren, Gewebeproteine zu extrahieren.

Die ersten Versuche dieser Art befaßten sich mit den Eiweißkomponenten des Muskels (JACOB J J C).[1] Einige Jahre später, 1952, teilte DEMLING (Literatur bei HOFMANN, SCHINKO)[8] seine Untersuchungen über Leberproteine mit, die er in 5 Fraktionen vorfand. Bald darauf veröffentlichten HENNING, KINZELMEYER, DEMLING und MANNUSS [2] ihre Arbeiten über Analysen der Organextrakte aus Leber und lymphatischen Geweben. KÜCHENMEISTER und VOIGT [3] fanden ebenfalls 5 Fraktionen in einem Leberpherogramm, wobei sie noch einen Eiweißkörper hinter dem -Globulin entdeckten. Auch ADJUTANTIS [4]

untersuchte Lebergewebe. Er homogenisierte in einer isotonischen Zuckerlösung und zentrifugierte. Die Überstände unterwarf er der elektrophoretischen Trennung. Das Verdienst, zuerst Hirngewebe untersucht zu haben, gebührt KAPS.[5]. Bei einer Durchsicht der Arbeiten, die sich bei der Darstellung der Hirneiweißkörper elektrophoretischer Methoden bedienten, ließen sich 3 Extraktionsverfahren erkennen.

KEUPP [6] extrahierte mit einem Äther-Alkohol-("Bloor") Gemisch im Vacuum bei -15°C. Das in einem Puffer pH 8,1 und einer 5 % Harnstofflösung gelöste Eiweiß wurde mit der freien Elektrophorese nach Tiselius und der Papierelektrophorese verarbeitet. Er erhielt 6 Fraktionen, bei der freien Elektrophorese noch 4 Untergruppen mehr. Er fand eine unterschiedliche Zusammensetzung in Rinde und Mark.

DEMLING, HENNING, KINZELMEYER,[7] extrahierten mit einem Veronalpuffer pH 7,2. Sie entdeckten mit der Papierelektrophorese 5 Fraktionen, unter denen die α-Globuline stark ausgeprägt waren, während Albumin und γ-Globuline in kleinen Konzentrationen vorlagen. Bei einer mikroskopischen Durchmusterung des Homogenats sahen sie zahlreiche, gut färbbare Zellkerne. Nach Meinung der Autoren war in den Pherogrammen nur Cytoplasmaeiweiß dargestellt worden. HOFMANN, SCHINKO,[8] die mit einem Veronalphosphatpuffer pH 8,6 arbeiteten, froren wiederholt die Homogenate ein, um das Kernprotein aufzuschließen. Das gleiche Verfahren übte auch ROBERTSON [9] aus. Letzterer beschrieb 7, HOFMANN, SCHINKO [8] sogar 9 Fraktionen. Außerdem bemerkten

sie eine α-Globulinvermehrung der Marksubstanz gegenüber der Rinde. BENASSI, ROBUSCHI,[10] entdeckten, daß nach Extraktion der Lipide mit Äther-Aceton die langsam wandernden Eiweißkörper in niedrigeren Konzentrationen vorlagen als vorher. Sie waren der Ansicht, daß die Hirnlipoproteine vornehmlich mit den ß- und γ-Globulinen wandern. KIYOTA [11] gab 1959 seine Ergebnisse bekannt, die er mit Hilfe der Tiseliusapparatur und der Papierelektrophorese gewonnen hatte. Er verwendete einen Veronalpuffer pH 8,0 und erhielt 7 Fraktionen, mit der Papierelektrophorese eine Vorfraktion und ein γ-Globulin, nach Tiselius 2 γ-Globuline und keine Vorfraktion. 1960 veröffentlichte ROBERTSON[24] seine Ergebnisse, die er nach der Untersuchung von Menschengehirnen gewonnen hatte. Er fand hier 8 Fraktionen.

Ein anderes Extraktionsverfahren wurde von KARCHER D. v.SANDE M, LOEWENTHAL A[12] angegeben. Sie versetzten die Hirnsubstanz mit einer 0,25 M-Saccharose und homogenisierten. Anschließend wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Mikroelektrophorese in Agar-Gel auf seine Eiweißbestandteile hin untersucht.

Die direkte Gewebselektrophorese beschrieb WIEME.[13] Eine feine Scheibe eines Gewebsstückes legte er in den Schlitz des Agarplättchens und schloß die E. an.

C. Eigene Untersuchungen mit der Veronalextraktion.

Es wurden eigene Untersuchungen mit der Extraktion in einem Veronalpuffer pH 8, 6 durchgeführt.
Es fanden sich nach dem Homogenisieren, Einfrieren,

Auftauen und Zentrifugieren in dem Überstand die Proteine in so niedriger Konzentration vor, daß erst nach Einengung eine für die Papierelektrophorese ausreichende Konzentration von 1,0 g% nach BIURET erreicht wurde. Überdies wurde ein Tropfen Veratren (ein Heparinpräparat der Chem.Fabrik Promonta GmbH Hamburg) hinzugefügt, um eine schärfere Trennung der einzelnen Banden zu erreichen (da der Lipoidreichtum des Gehirns für die Beweglichkeit der Proteine bei der Papierelektrophorese hinderlich war).
Es stellten sich 8 Fraktionen dar, da die unbeweglichen, aber nicht denaturierten Proteine, die γ_2- Globuline genannt wurden, mitgerechnet wurden.

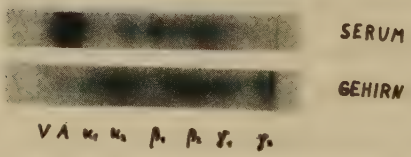


Bild 1
Pherogramm nach Veronalextraktion

Die Mucopolysaccharide, zu denen Heparin gehört, wandern im elektrischen Feld vor den Albuminen auf der Höhe der Vorfraktion. Papierelektrophoretisch wurde Veratren in den Mengen, wie es den Extrakten zugesetzt wurde, untersucht,und es wurde nie eine Anfärbung auf dem Papierstreifen gesehen.

Als Bezugspunkte dienten Albumin und Transferrin. Hiernach war nicht mit einer Beeinflussung der Vorfraktion zu rechnen. Die Versuche mit der Veronalextraktion und dem Heparinzusatz wurden nicht zu Ende geführt, da sich die erwartete schärfere Differenzierung im Bereich der langsamen Fraktionen nicht regelmäßig erreichen ließ und der Gebrauch des Preßsaftes, der ohne Heparinzusatz elektrophoretisch untersucht wurde, sich einfacher gestaltete und bessere Ergebnisse brachte.

D. Material und seine Aufarbeitung.

Bei unseren Untersuchungen wurden 7 menschliche Gehirne aus dem Obduktionsmaterial des path.-anatomischen Instituts des UKE und des Gerichtsmedizinischen Instituts der Universität Hamburg verwandt.* Die Todesursache dieser Personen war unfallbedingt oder plötzliches Herzversagen. Das Lebensalter lag zwischen 40 und 75 Jahren. Bei 2 Gehirnen wurde im path.-anatomischen Institut je eine Hemispäre durchspült, um herauszufinden, inwieweit das Hämoglobin, das bei ausgebluteten Gehirnen mehr oder weniger stark im Preßsaft auftritt, die Größe der β-Globulinfraktion mitbestimmte. Es wurden in die A.basialis

* An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dotzauer, Gerichtsmedizinisches Institut der Uni.Hamburg, und Herrn Privatdozent Dr. Pliess, path.-anatomisches Institut des UKE, für die bereitwillige Überlassung der Gehirne bedanken.

und in die A.carotis interna, die die zu durchspülende Hemisphäre versorgte, Infusionsschläuche eingeführt und festgebunden, während die A.communicans anterior und die A.communicans posterior der anderen Hemisphäre unterbunden wurden, sodaß alle Blutbestandteile aus der einen Hemisphäre herausgespült werden konnten. Die Gehirne wurden in ein Gefäß mit phys.Kochsalzlösung gebracht und mit insgesamt 10-15 Liter einer 0,9 % Na Cl-Lösung unter einem Druck von 100 cm Wassersäule durchspült, bis das Gewebe blass und weißlich aussah. Vor dem Einfrieren wurden die Hirnhäute entfernt. Die Temperatur in der Kühltruhe betrug -15°C. Zur Präparation wurden die Gehirne bei Zimmertemperatur aufgetaut und im halbgefrorenen Zustand in frontale, parietale und occipitale Rinde, frontale und parietale Weiße Substanz, Stammganglien, Pons und Kleinhirn zerlegt und wieder eingefroren. Die einzelnen Hirnbezirke wurden wiederum bei Zimmertemperatur aufgetaut und, nachdem das etwa noch vorhandene Blut mit phys.Kochsalzlösung abgespült war, bei 0°C homogenisiert und 30 min.bei 15000 U./min. und bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand, der bei den durchspülten Gehirnen klar und hell war, bei den übrigen je nach Blutreichtum des betreffenden Gehirns mehr oder weniger hämolytisch gefärbt war, wurde in einer Mikropipette aufgesogen und elektrophoretisch untersucht.

E. Methodik der Papierelektrophorese.

Auf einem Whatman Nr.1 Streifen wurden 0,02 ml Preßsaft aufgetragen. 2 Streifen wurden in einer feuchten Kammer [14] der Trennung unterworfen. Der Spannungsabfall über dem Papierstreifen betrug etwa 60 Volt. Als Elektrophoresepuffer diente uns ein Veronalacetatpuffer pH 8,6 (49g Na-Veronal, 32,4g Na-acetat, 23mal 2n HCl auf 5oooml aufgefüllt). Auf den Begleitstreifen wurde ein Tropfen einer Albumin-Transferrin Mischung oder 0,01 ml Serum aufgetragen. Die Laufzeit betrug 16 Stunden. Die Streifen wurden mit Amidoschwarz 10B gefärbt und in Methanol-Essigsäurebädern entfärbt. Die Auswertung erfolgte nach GRASSMANN [15] im Photometer Eppendorf bei 546mμ, nachdem vorher in der Immersionsflüssigkeitevakuiert war [16].

F. Methodik der Elektrophorese in Agar-Gel.

Bei der Elektrophorese in Agar-Gel wurde die von R. J. WIEME [13] so genannte Technik III angewandt: Die Agar-Gel Elektrophorese mit direktem Kontakt zwischen Gel und Pufferlösung und mit Petroläther zur Kühlung und Verhinderung der Wasserverdunstung. Eine Stammlösung (17,0g Na-Veronal. 23ml 1n HCl und Aqua dest. ad 1oooml) wurde 1 zu 1 verdünnt mit Aqua dest. und diente als Puffer, pH 8,3. Es wurde verwandt Difco Bacto-Agar zur Herstellung der Elektrophoreseplättchen und zur Auffüllung des E-Behälters. Es wurde eine 1 % Lösung hergestellt, die bis zum Klarwerden gekocht und

bis etwa Handwärme abgekühlt wurde. Das Agar Sol wurde in die Elektrodentröge des Behälters gegossen und in so hoher Schicht gefüllt, daß der danebenliegende Trog ebenfalls gefüllt wurde, aber nur bis zum Rand der inneren Wandung. Es wurde darauf geachtet, daß kein Agar in den Innenraum floss. Aus dem Elektrodentrog wurde genau die Hälfte des erstarrten Agars herausgeschnitten. Der Agar blieb dann 24 Stunden stehen. Vor dem Ingangsetzen der Elektrophorese wurde von den Agarplatten je eine Schicht herabgenommen und sie bds. auf den inneren Agarblock gelegt, um einen möglichst guten Kontakt zu erreichen.

Die Agarplatten wurden wie folgt hergestellt: In eine flache, runde Petriglasschale (r=7cm), die auf einer ebenen Grundlage sich befand, wurde flüssiger Agar gegossen. Sobald der Agar zum Gel erstarrt war, wurden gereinigte Objektträger darauf gelegt und mit soviel Agar-Sol überschichtet, daß eine etwa 1,5 mm hohe Agarschicht die Platten bedeckte. Sie wurden mit einer Glasschale bedeckt, um eine Austrocknung zu verhindern, und 24 Stunden stehen gelassen. Dann wurden die Agarplatten herausgeschnitten und auf die Mitte ein 1,5x10,0 mm großes Filtrierpapier, das vorher intensiv mit Hirnhomogenat getränkt war, aufgelegt und 30 min.dort belassen, um das Eiweiß in den Agar hineindiffundieren zu lassen. Das Filtrierpapier wurde mit einer Pinzette entfernt und in einen Spalt am Rande der Agarplatte ein Tropfen einer MAS-Lösung gebracht (10,0mg Albumin, 10,0mg Transferrin und 0,1ml einer

10% Makrodexlösung). Die elektrophoretische Trennung erfolgte während 30 min. bei 110 V und 30 mA/cm. In der Fixierflüssigkeit -70% Äthanol und 5% Essigsäure- trübte sich das Makrodex weißlich grau, sodaß es leicht durch einen Einschnitt markiert werden konnte. Mit Hilfe dieser 3 konstanten, festen Punkte -Albumin, Transferrin und Makrodex- war es möglich, die relativen Mobilitäten der Proteine zu bestimmen.[17,18,19] Die Agarplatten wurden nach dem Fixieren mit Filtrierpapier, das mit der Fixierflüssigkeit angefeuchtet war, bedeckt und im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Das Filtrierpapier wurde entfernt, und die Agarplatten 1 Stunde lang in folgender Lösung gefärbt:

0,5g Amidoschwarz, 5,0g HgCl,5,0ml Eisessig und Aqua dest. ad 100,0. Entfärbt wurde in wechselnden Bädern mit 5 % Essigsäure. Daran schlossen sich die Auswertung der Pherogramme im Photometer Eppendorf bei 546mμ Schichtdicke und die Mobilitätenmessung an.

Ergebnisse:

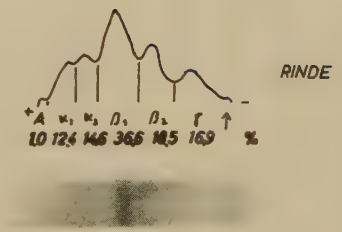
Die Proteinkonzentration des Preßsaftes betrug 1,0-1,3 g%. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von KAFKA.

G. Ergebnisse der Papierelektrophorese.

Es wurden 2 Gehirne untersucht. Es fanden sich 8 Fraktionen, die entsprechend dem Liquerproteinen bezeichnet wurden. (Tabelle 1)

Tabelle 1	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ_1	γ_2
Rinde	1,4	2,5		21,6	46,0	18,9	7,3	2,3
	1,0	2,5	7,9	20,2	24,6	30,0	13,8	
		1,0	12,4	14,6	36,6	18,5	16,9	
Weiße Subst.		5,4	5,8	13,7	44,4	15,3	5,5	9,9
		3,2	24,9		33,5	17,2	14,1	5,3
Stammganglien	2,2	9,3	32,3		25,7	13,3	13,1	4,1
	1,3	4,7	19,9		39,4	16,4	7,9	10,4
Nucleus niger		0,5	9,3	14,4	32,8	26,4	9,8	6,8
Talamus		1,5	2,9	18,5	35,0	15,2	16,0	10,9
Kleinhirn	1,1	3,5	22,8	14,1	38,0	14,4	4,6	1,5
Durchspült:								
Rinde		3,2	8,9	27,3	24,4	15,8	7,3	13,1
Stammganglien		2,5	5,9	6,4	31,4	26,6	11,2	16,0
Weiße Subst.		6,8	18,2	18,4	22,8	22,4	11,4	

Der letzte, noch hinter dem γ_1-Globulin wandernde Eiweißkomplex erhielt die Bezeichnung γ_2 .. Die sogenannten γ_2-Globuline nahmen eine Sonderstellung ein, da sie in ihrer Beweglichkeit deutlich hinter den Serum-γ-Globulinen zurückblieben und fast immer an der Auftragslinie oder in deren unmittelbaren Nähe beobachtet wurden, Eine Vorfraktion konnte nur in der Rinde, Kleinhirn und Stammganglien nachgewiesen werden, nicht in der weißen Substanz. Im Thalamus erschien keine Vorfraktion. Albumin befand sich in allen Hirnbezirken, in der Rinde in geringerem Maße als im Mark; am stärksten war es in den Stammganglien vertreten. Vom Albumin ließen sich gut die α-Globuline abgrenzen, die nicht regelmäßig in zwei Banden unterteilt waren. Die β_1-Globuline stellten sich als stärkste Fraktion dar. Auch der Anteil an β_2-Globulinen war relativ hoch. Die γ_1 und γ_2-Globuline wurden nicht immer, besonders in der grauen Substanz, voneinander getrennt. Insgesamt liegen beide zwischen 10 und 20 %. Die Beweglichkeit der einzelnen Eiweißkörper war unterschiedlich. Sowohl die langsamen wie die schnellen Proteine wanderten auf den einzelnen Streifen verschieden rasch.



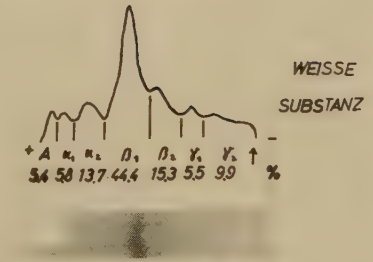
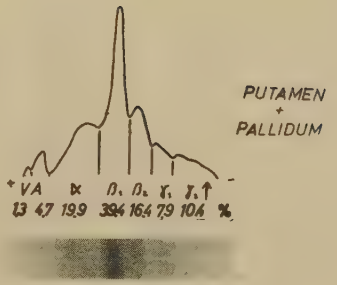


Bild 2:
Rinde und Weiße Substanz



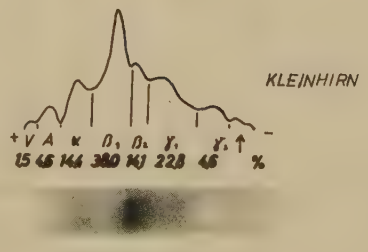
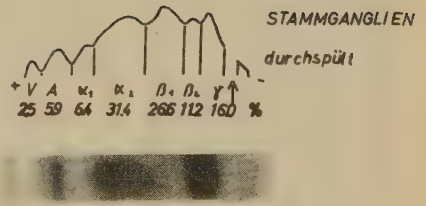


Bild 3:
Putamen - Pallidum und Kleinhirn



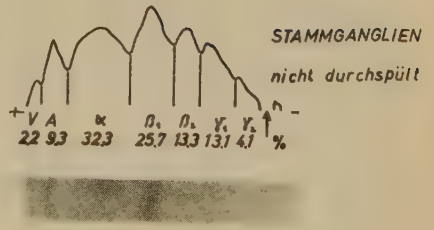


Bild 4:
Stammganglien

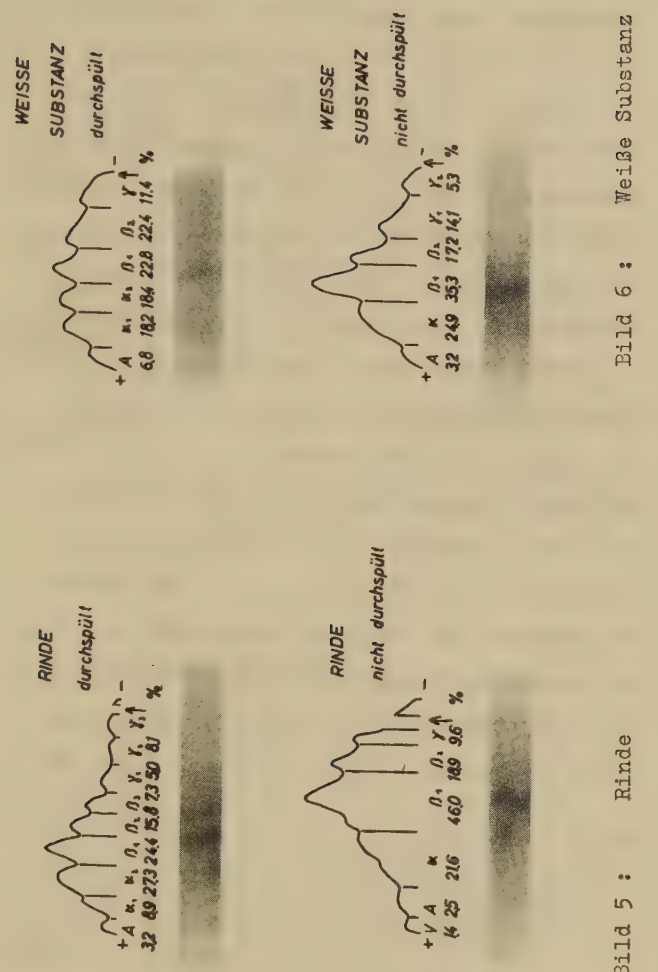


Bild 5 : Rinde

Bild 6 : Weiße Substanz

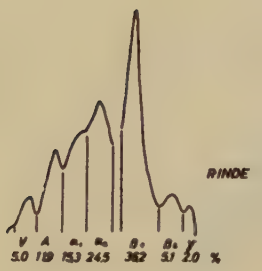
H. Ergebnisse der Elektrophorese in Agar-Gel.

Es wurden bei 5 Gehirnen frontale, parietale und occipitale graue und weiße Substanz, sowie Stammganglien, Pons und Kleinhirn der elektrophoretischen Analyse

unterzogen. Insgesamt wurden 33 Präparate - 11 der Rinde, 10 der weißen Substanz, 4 der Brücke, 4 der Stammganglien und 4 des Kleinhirns - photometrisch ausgewertet und die quantitative Verteilung planimetrisch errechnet. Verwertbar waren nur gut getrennte Pherogramme. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2, 3 und 4 niedergelegt. Anschließend errechneten wir die relativen Mobilitäten. Als Bezugspunkte nahmen wir Albumin, Transferrin und Dextran, das den Nullpunkt markierte.
Die Wanderungsgeschwindigkeit des Albumins betrug 1,00 ; relativ dazu erhielten wir für Transferrin einen Wert von 0,48. Nur solche Pherogramme, bei denen die Testflecke eine entsprechende Wanderungsgeschwindigkeit zeigten, (bei uns schwankten die Werte zwischen 0,46 und 0,50) erlaubten eine Auswertung (Tab.7).

Tabelle 2: Proteine der Rinde in %.

	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Rinde							
frontal	1,4	14,2		44,5	30,2	6,9	2,8
	6,6	7,8	21,7	24,0	35,4	2,4	2,1
	0,9	10,9	18,7	29,5	35,8	1,8	2,4
	7,4	6,4	17,1	37,4	27,7	1,9	2,1
parietal	6,0	8,0	11,6	36,2	35,2	1,4	1,6
	5,2	5,0	19,4	27,4	35,3	4,6	3,1
	2,1	11,3	15,5	21,6	46,7	1,3	1,5
	5,0	11,9	15,3	24,5	36,2	5,1	2,0
	1,0	10,0	14,3	35,5	29,8	6,3	3,1
occipital	6,2	8,9	18,2	25,1	37,0	2,5	2,1
	5,4	4,0	13,8	33,5	38,4	3,5	1,4
Durchspült:	1,4	7,1	21,0	40,0	23,8	4,7	2,0
	3,2	7,5	15,4	36,9	24,2	8,9	3,9
	8, 2	7,2	21,6	27,6	26,0	5,3	4,2



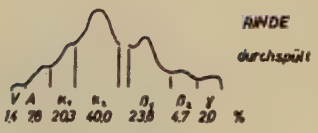


Bild 7: Rinde

Tabelle 3: Proteine der weißen Substanz in %.

Weiße Substanz	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
frontal	0,7	7,0	16,2	17,7	50,2	4,6	3,6
	3,1	12,6	6,5	28,9	38,1	6,1	4,7
	3,9	9,5	16,3	37,6	27,9	3,4	1,4
parietal	2,9	5,5	22,7	20,7	41,1	4,2	2,9
	1,4	12,7	20,0	24,9	33,5	5,1	2,4
	0,4	7,0	24,1	33,7	33,4	0,8	0,6
	1,0	11,1	18,9	18,3	42,3	4,8	3,6
	0,6	11,7	22,8	28,8	28,2	3,8	4,1
occipital	2,7	8,7	7,8	18,9	55,2	3,6	3,1
	0,4	4,6	24,7	27,0	27,2	4,0	2,1
Durchspült:	1,9		20,8	35,2	29,6	7,6	4,9
	2,0	6,1	33,1	18,4	28,8	7,2	4,4

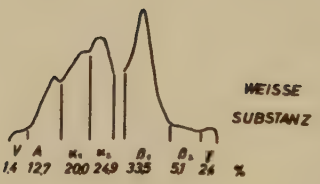
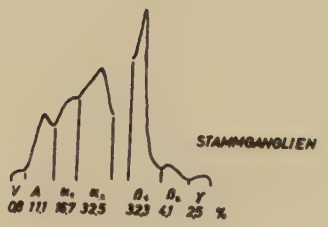


Bild 8 : Weiße Substanz

Proteine der Stammganglien in %

Tabelle 4:

V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1,0	4,1	17,9	35,4	31,2	7,9	2,5
0,8	11,1	16,7	32,5	32,3	4,1	2,5
1,9	18,1	16,4	23,2	36,4	2,3	1,7
7,5	10,4	19,9	24,9	30,3	4,7	2,3



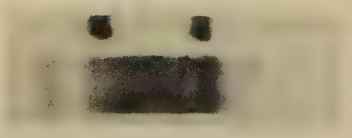
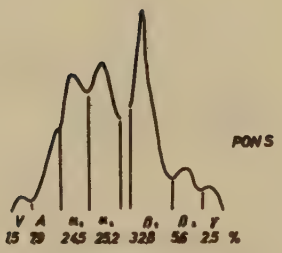


Bild 9 : Stammganglien

Proteine des Pons in %.

Tabelle 5:

V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1,5	7,9	24,5	25,2	32,8	5,6	2,5
0,7	18,4	10,9	24,2	39,7	2,9	3,2
1,4	10,0	12,1	24,9	39,8	8,3	3,5
2,5	3,4	31,3	15,9	38,2	6,2	2,5



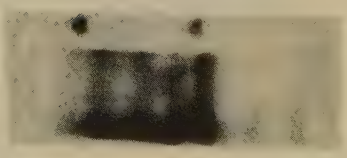


Bild 10 : Pons

Proteine des Kleinhirn in %.

Tabelle 6:

V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1,8	13,8	14,3	26,9	36,6	5,3	1,3
5,7	6,8	24,2	26,6	33,0	2,2	1,7
5,9	10,0	18,7	25,7	31,3	5,3	3,1
3,7	8,3	18,3	30,9	33,1	3,3	2,4

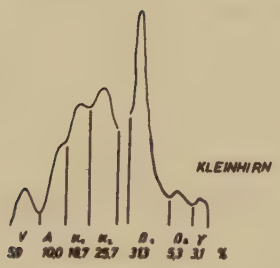
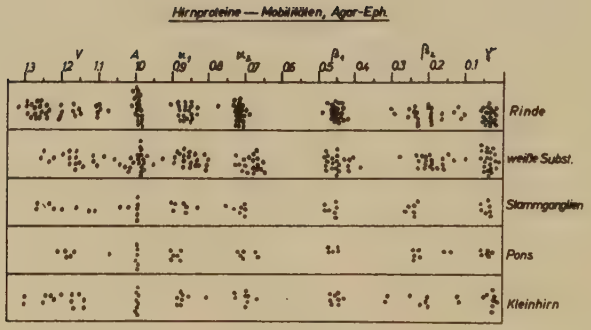


Bild 11 : Kleinhirn

Tabelle 7: Mobilitäten



Die Agar-Gel-Pherogramme zeigten 7 Fraktionen. Im Kleinhirn fanden sich ziemlich regelmäßig 2 Vorfraktionen. In der Rinde und in den Stammganglien wurden sie bei jedem zweiten Pherogramm beobachtet. Sie waren manchmal nicht so scharf getrennt, wie es beim Kleinhirn zu sehen war. Die Vorfraktionen, die stark in die Breite auseinandergezogen waren und keine Minima zwischen sich zeigten, wurden bei der folgenden Zusammenstellung außer Acht gelassen. Im Ponsgebiet traten zwei Vorfraktionen in keinem Fall, in der weißen Substanz ausgesprochen selten, nebeneinander auf.

Tabelle 8 : 2 Vorfraktionen

	Rinde	Mark	Stammg.	Pons	Kleinh.
Präparate insgesamt	32	27	8	7	8
2 Vorf.	14	3	4	0	7

Wie die Mobilitätenmessungen ergaben, wanderten die Vorfraktionen zwischen 1,1 und 1,3 ME . Hier ließen sich keine Untergruppen feststellen, vielmehr bewegten sie sich regellos und verstreut in ihrem Bezirk. In der weißen Substanz wurde eine scharfe Abgrenzung zum Albumin vermißt. Nur in Rinde und Kleinhirn gelang es, die Vorfraktion in eine schnell und in eine langsam wandernde Gruppe zu unterteilen.

Albumin war in allen Gebieten gleichmäßig stark vertreten. Seine Beweglichkeit im elektrischen Feld war unter gleichen Bedingungen konstant.

Die Mobilitäten der α_1-Globuline lagen zwischen 0,825 und 9,0 ME in allen untersuchten Hirnregionen. Auch die prozentuale Verteilung war gleich. Die α_1-Globuline zeigten in der Rinde, in den Stammganglien und im Kleinhirn etwas höhere Werte als in der weißen Substanz und in der Brücke. Die Wanderungsgeschwindigkeit der α_2-Globuline der weißen Substanz war etwas langsamer als in den übrigen Hirnbezirken.

Wie bei den papierelektrophoretischen Analysen, so waren auch bei der Elektrophorese in Agar-Gel die β_1-Globuline die stärkste Fraktion. Die niedrigsten Werte, 31 und 32 %, waren am häufigsten in den Stammganglien und im Kleinhirn zu entdecken, während die höchsten Werte Pons und weiße Substanz aufwiesen. Die relativen Mobilitäten betrugen konstant 0,45 ME.

Die β_2- und γ -Globuline waren im normalen Gehirn nur im geringen Maße anzutreffen: β_2 mit 4 % und γ zwischen 2,0 und 3,0 %. Mobilitätenmäßig wanderten die γ- Globuline zwischen 0,01 und 0,05 ME, die β_2-Globuline im Bereich von 0,1 bis 0,3 ME ohne echte Gruppenbildung. Die Verteilung war regellos. In den Stammganglien war bisher nur ein schnell wanderndes β_2-Globuline nachzuweisen. Bei einem Gehirn zeigten sich 2 β_2 -Globuline im Kleinhirn, in der Brücke und in der Rinde.

Ergebnisse der Durchspülung (Tabelle 1, 2 und 3) : Die beiden Gehirne, deren eine Hemisphäre durchspült wurde, wurden in Agar-Gel und eines papierelektrophoretisch auf ihre Eiweißzusammensetzung hin untersucht.

Die β_1-Globulinkonzentration war bei beiden Methoden um 10 bis 12 % niedriger als bei den "ausgebluteten" Gehirnen, während die Menge der α_2-Globuline anstieg.

I. Reproduzierbarkeitsuntersuchungen.

Um die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode zu überprüfen, wurden Doppel- und Dreifachbestimmungen mit dem gleichen Homogenat aus einer bestimmten Hirnregion durchgeführt und anschließend photometrisch und planimetrisch die Größe der Eiweißkomponenten in den Pherogrammen errechnet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgezeichnet.

Es handelt sich ausschließlich um Agar-Gel elektrophoretische Untersuchungen.

Es wurde die mittlere Abweichung errechnet, der Aufstellung der höchste Wert der Abweichung sowie die höchsten und niedrigsten Zahlen, die wir für die einzelnen Fraktionen gefunden, hinzugefügt. Größte Streuungen zeigten die Proteine der Vorfraktion, aber auch bei den β_1-Globulinen sah man in vereinzelten Fällen größere Schwankungen bei wiederholter Messung. Im großen und ganzen waren die Befunde der Agar-Gel Elektrophorese reproduzierbar.

Tabelle 9 und 10

Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen in %.

Abk.: fron.=frontal,
par. =parietal,
occ. =occipital,
R =Rinde
M =Mark
d =Mittlere Abweichung
h =höchster Wert der Abweichung
in Klammern () die höchsten und niedrigsten Werte der einzelnen Messungen.

Tabelle 9 : Ergebnisse der Reproduzierbarkeits-untersuchungen in %.

Gehirn H	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
fron.R.	8,0	7,7	17,3	30,0	25,6	6,1	5,3
	5,7	7,8	19,2	36,0	26,0	3,4	1,9
par.R.	1,3	7,2	21,2	22,0	43,2	3,4	1,7
	2,1	8,3	17,9	24,5	37,2	6,2	3,8
	7,4	8,0	21,0	25,0	32,9	3,4	2,3
fron.M.	2,1	8,9	15,4	33,5	31,6	5,5	3,0
	3,6	9,8	17,8	37,7	26,7	2,4	2,0
Stammg.	6,9	11,4	21,5	24,6	26,7	5,1	3,8
	1,7	8,1	22,3	32,3	27,5	4,9	3,2
Pons	2,7	8,9	25,6	21,6	30,5	7,0	3,7
	1,5	7,9	24,5	25,2	32,8	5,6	2,5
Kleinh.	1,3	7,1	24,7	24,0	35,7	3,3	3,9
	6,8	7,5	22,7	24,6	33,6	1,9	2,9
Gehirn E							
fron.R.	1,3	11,9	15,9	25,7	37,2	5,3	2,7
	7,7		23,9	28,4	32,8	4,4	2,8
	6,1	13,1	12,5	28,3	32,0	4,7	3,3
par.M.	2,0	10,2	16,3	13,4	48,9	5,1	4,1
	1,3	11,8	19,2	15,0	42,2	6,2	4,3
Pons	0,5		26,8	17,9	43,2	7,4	4,2
	3,0		32,4	18,1	34,2	7,1	5,2
Kleinh.	1,0	7,3	17,9	23,8	42,2	4,4	3,9
	5,9	10,0	18,7	25,7	31,3	5,3	3,1
Stammg.	1,0	10,8	19,3	28,3	32,3	5,2	3,1
	0,8	11,1	16,7	32,5	32,3	4,1	2,5

	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Gehirn W							
Kleinh.	4,1	9,2	13,3	32,3	33,9	3,3	3,9
	1,7	12,4	14,8	34,2	32,9	2,3	1,7
Stammg.	1,5	16,9	18,0	23,5	32,0	8,1	
	2,0	16,5	14,5	25,0	36,5	5,5	
par.M.	2,0	13,3	20,7	24,0	30,7	5,3	4,0
	0,9	7,2	24,1	30,5	34,7	1,7	0,9
	1,3	7,9	22,2	32,0	32,6	2,7	1,3
par.R.	2,0	7,5	24,5	21,0	35,0	6,0	4,0
	1,6	11,4	19,5	26,2	33,7	4,9	2,7
	2,1	11,3	15,5	21,6	46,7	1,3	1,5
front.R.	1,1	10,9	19,5	29,4	31,5	5,4	2,2
	1,6	5,0	20,3	30,0	34,7	4,8	1,6
	0,9	10,9	18,7	29,5	35,8	1,8	2,4
Gehirn B							
par.R.	1,4	3,0	15,2	32,6	42,0	4,4	1,4
	1,0	6,5	16,5	27,5	40,5	5,5	2,5
	5,9	9,0	12,2	29,6	34,8	5,9	2,6
occ.M.	1,2	10,4	13,4	15,3	51,2	8,5	
	4,7	5,5	16,5	20,9	44,9	4,3	3,2
	2,9	10,1	9,7	18,8	49,0	5,7	3,8

Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen in %.

Tabelle 10:

	V	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
	(0,5-8,0)	(3,0-16,9)	(9,7-25,6)	(13,4-37,7)	(25,2-51,2)	(1,3-7,4)	(0,9-5,5)
d	2,7	2,5	3,1	3,3	5,2	1,9	1,4
h	6,4	6,1	9,5	8,0	13,0	4,7	3,4

J. Diskussion.

Bisher sind noch keine Veröffentlichungen über elektrophoretische Untersuchungen von Hirnpreßsäften bekannt geworden, sodaß keine Vergleichs- und Bezugsmöglichkeiten bestehen. Nach unserer Aufarbeitungsmethode erhielten wir eine halbe Mikropipette voll Preßsaft, was sowohl die Elektrophorese in Agar-Gel, die ja eine Mikromethode ist, als auch die Papierelektrophorese erlaubte. Mit den gewonnenen Mengen ließ sich etwa 5 mal eine Elektrophorese in Agar-Gel durchführen. Diese Methode besaß den Vorzug, daß sie mit relativ wenig Mühen verbunden und schnell auszuführen war. Die Proteine lagen in einer der Elektrophorese angemessenen Konzentration vor. Eine Einengung erübrigte sich. Denaturierungen der Eiweißkörper wurden nicht beobachtet. Selbst nach dreitägigem Aufbewahren bei einer Raumtemperatur von $+4^{\circ}C$ konnten noch keine Veränderungen der Pherogramme festgestellt werden.

Die stärkste Fraktion in unseren Pherogrammen bildeten bei Papier- und Agar Gel elektrophoretischen Untersuchungen die β_1-Globuline. Sie wanderten im elektrischen Feld zwischen 0,45 und 0,48 ME und waren durch ausgeprägte Minima von den Nachbarfraktionen abgegrenzt. Ihre relativen Konzentrationen lagen nach den Ergebnissen der Agar Elektrophorese durchschnittlich zwischen 30 und 38 %; ähnliche Werte erbrachten auch papierelektrophoretische Analysen. (Tab.1)

In der Literatur wurden niedrigere Zahlen mitgeteilt. So gaben HOFMANN und SCHINKO[8], DEMLING [7] und ROBERTSON [9] Werte um 20 % bekannt. Letzterer veröffentlichte in einer späteren Arbeit[23] Zahlen für β_1-Globulin zwischen 20 und 25%; LOEWENTHAL [12] und Mitarbeiter, die von einem hämolytisch verfärbten Extrakt sprechen, fanden Konzentrationen um 30 %. Unsere etwas höheren Werte hingen sicherlich mit einer Verunreinigung des Preßsaftes mit Hämoglobin zusammen. Die Hämoglobinmenge im Preßsaft war abhängig vom Blutreichtum des betreffenden Gehirns. Bei einem anämischen Gehirn wurden niedrigere β_1-Globulinwerte gefunden als bei hyperämischen. Da wir die Gehirne frühestens 24 Stunden nach dem Tod erhielten, war die Ausblutung nicht mehr optimal durchzuführen. Die kleineren Zahlenangaben in der Literatur bezüglich der β_1-Globuline waren einmal dadurch bedingt, daß Tiergehirne untersucht wurden. Diese Gehirne wurden gleich nach der Tötung entnommen und konnten dann fast völlig ausgeblutet werden. Bei den untersuchten Menschengehirnen bestand die Möglichkeit, daß eine Ausblutung besser zustande gebracht wurde oder eine Auswahl unter wenig blutreichen Gehirnen getroffen werden konnte.

Bei 2 Gehirnen wurde je eine Hemisphäre durchspült, um nachzuweisen, daß der Blutfarbstoffgehalt im Preßsaft die Größe der β_1-Fraktion mitbestimmt. Danach fand sich eine Differenz von

etwa 10 % zwischen durchspülten und nicht durchspülten Hirnbezirken. Die endgültige Bestätigung muß durch Tierversuche erbracht werden, da nach dem Tode einerseits die Permeabilitäten aller Membranen gesteigert sind und beim Durchspülen Hirnproteine, die in die Gefäße hineindiffundieren, mit herausgeschwemmt werden, zum anderen aus den kleinen Gefäßen nicht alles Blut herausgetrieben werden kann. Nach Rattenversuchen, die zu diesem Zweck an der Neurologischen Klinik UKE durchgeführt wurden, lagen die β_1-Globulinwerte in einem völlig blutleeren Gehirn bei 10 %, in einem ausgebluteten bei 20 % [21].

Bei unseren papierelektrophoretischen Untersuchungen der Hirnhomogenate trat ____ ziemlich regelmäßig in Regionen mit überwiegendem Bestand an grauer Substanz wie Rinde, Stammganglien und Kleinhirn eine Vorfraktion auf. In der weißen Substanz und in der Brücke war sie nicht nachzuweisen. HOFMANN, SCHINKO[8] und ROBERTSON [9] beschrieben sie auch für die weiße Substanz. Bei der Agar-Gel Elektrophorese zeigten sich die Proteine der Vorfraktion in allen Hirnregionen. In der Brücke und im Marklager wurden niedrigere Konzentrationen gemessen als in der grauen Substanz, mit Ausnahme der Stammganglien, die der weißen Substanz ähnliche Verhältnisse aufwiesen. Nur bei einem Gehirn entsprachen die Konzentrationen in Mark und Rinde einander. Im Kleinhirn stellten sich fast immer 2 Vorfraktionen dar, weniger häufig in der Rinde

und den Stammganglien, selten in der weißen Substanz (Tab.6). Diese Befunde waren in gewissem Maße hinweisend für Hirnbezirke mit vorwiegendem Bestand an grauer Substanz. Interessant wäre es festzustellen, ob das, was für die Serum-und Liquorvorfraktionen nachgewiesen ist, auch für die Hirnvorfraktionen Gültigkeit besitzt, nämlich daß die schnellwandernden Vorfraktionen einem tryptophanreichen Eiweißkörper, die langsamen den α_1-Lipoproteinen zuzuordnen sind [22].

Albumin war in allen Hirnregionen vorhanden. Bei der Agar Elektrophorese lagen die Werte höher als bei der Papierelektrophorese. Bei den durchspülten Gehirnen wichen die erhaltenen Werte nur geringfügig von denen der nicht durchspülten ab, sodaß eine Verunreinigung mit Serumalbuminen, wie sie wegen der Hämoglobinbeimischung zum Preßsaft nicht unwahrscheinlich schien, ausgeschlossen werden konnte. Die Prozentzahlen für Albumin in der Literatur variierten. So teilten HOFMANN, SCHINKO[8] niedrigere, DEMLING [7] höhere Zahlen mit. In der freien Elektrophorese nach Tiselius fand KIYOTA [11] größere Mengen als mit der Papierelektrophorese.

Die α-Globuline ließen sich in ihrem Verhalten schwer beurteilen, da sich bei Papier- und in einem geringeren Ausmaße auch bei Agar-Gel Elektrophoretischen Analysen Differenzen,vornehmlich im Bereich der α_1-Globuline, einstellten, die auf eine verschwommene Trennung dieser Eiweißkörper zurückzuführen waren. Unscharfe Tren-

nungen traten häufiger in der weißen als in der grauen Substanz auf. Mobilitätenmäßig blieb ein erheblicher Anteil der α_2-Globuline der weißen Substanz hinter denen der übrigen Hirnregionen zurück. Ob die Verlangsamung der Proteine der weißen Substanz mit einem erhöhten Lipidgehalt dieser Substanz in Zusammenhang steht, ist in weiteren Untersuchungen zu klären. HOFMANN,SCHINKO[8] stellten eine leichte Vermehrung der α-Globuline im Mark gegenüber der Rinde fest. Nach unseren Ergebnissen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die α_2-Globuline waren im Mark eher leicht vermindert, was auch KIYOTA [11] beobachtete. Obendrein wichen die Werte für die α_2-Globuline erheblich voneinander ab, sodaß man die quantitativen Befunde nicht zu einer Differenzierung heranziehen konnte.

Die Pherogramme auf den Papierstreifen zeichneten sich durch hohe Konzentrationen der langsam wandernden Proteine aus. Die ß und γ-Globuline wiesen bei den einzelnen Gehirnen keine Übereinstimmung auf. Auch die Wanderungsgeschwindigkeit schwankte bei den einzelnen Streifen: so die Entfernung zwischen Auftragslinie und $ß_1$-Globulin und zwischen $ß_1$-Globulin und Albumin. Hohe Werte für ß- und γ-Globuline fanden auch HOFMANN,SCHINKO,[8] sowie BOOIJ [24] und ROBERTSON[23]. ROBUSCHI und BENASSI [10] führten diese Verhalten auf den hohen Lipidgehalt der Hirnsubstanz zurück. Sie fanden nach Äther-Aceton Extraktionen eine Abnahme der $ß_\Sigma$ und γ-Globuline

und einen Anstieg der α-Globuline. Sie nahmen an, daß die Lipide vorzugsweise mit den langsamen Eiweißfraktionen wandern und entweder als Lipoproteine vorliegen oder an die Zellulose adsorbiert werden. Auch die Wanderung in einer Richtung von der Kathode zur Anode begünstigte unserer Meinung die schlechte Trennung. Es lag nahe anzunehmen, daß einige Fehlerquellen der Papierelektrophorese- wie chemisch-physikalische Reaktionen zwischen Trägermedium- und objekt, Wärmeentwicklung, Pufferströme und kleines Wasserreservoir-, wegen des Lipidreichtums der Homogenate bei der Trennung sich stärker bemerkbar machten und so die im Vergleich zur Agar-Gel Elektrophorese schlechteren Ergebnisse bewirkten.

Mit dieser Methode konnten eindeutigere Feststellungen über das Verhalten der β_2- und γ-Globuline getroffen werden.
Unsere β_2- -Globulinwerte lagen nach den Agar-Untersuchungen zwischen 1,3 und 7,4 %, also erheblich niedriger als bei der Papierelektrophorese. Da die Wanderungsgeschwindigkeit uncharakteristisch war, konnten keine unterschiedlichen Merkmale festgestellt werden.
Nach eigenen Untersuchungen lagen die Werte für die γ-Globuline in allen Hirnbezirken durchschnittlich um 2,5 %. Etwas größere Mengen fanden LOEWENTHAL [12] und Mitarbeiter. Sie deuteten an, die γ-Globuline seien in den höheren Hirnbezirken gegenüber dem Stammhirn vermehrt. Entsprechende Befunde zeigten die eigenen Ergebnisse nicht. Mobilitätenmäßig wanderten die

γ-Globuline in einem kleinen, umschriebenen Bereich im Gegensatz zu den Serum-γ-Globulinen. Durch die Agar-Gel Elektrophorese waren die γ-Globuline gut charakterisiert, sodaß man erwarten durfte, daß bei pathologischen Prozessen des ZNS, die mit einer Erhöhung der Liquor-γ-Globuline einhergehen, ähnliche Befunde im Hirngewebe erhoben werden könnten. So entdeckten LOEWENTHAL[12] und Mitarbeiter sowie H.BAUER [21] eine Vermehrung der γ-Globuline in einem Panencephalitisgehirn. Die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Möglichkeit, pathologische Veränderungen am ZNS erkennen zu können, war ein Vorzug vor der Papierelektrophorese.

Andererseits war die Agar-Gel Elektrophorese mit Unzulänglichkeiten behaftet. So gingen von dem Eiweiß, das an der Auftragungsstelle in großer Menge denaturiert war, sogenannte Fähnchen aus, die sich besonders im Bereich der α-Globuline störend bemerkbar machten. Unsauberes Auftragen der Probe bewirkte "Schlagwellen". Wesentlich für das Gelingen war, daß die Versuchsbedingungen eingehalten wurden, z.B. der Agar nach seiner Zubereitung nicht zu früh für die Elektrophorese verwandt wurde. Ebenso mußte die Pufferlösung in kurzen Zeitabständen frisch zubereitet werden, und eine Wasserverdunstung bei der Ausführung der Elektrophorese verhindert werden. Auf entsprechende Fehler waren unscharfe Trennungen unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, ein negatives γ-Globulin zurückzuführen.

Abbildung 12 zeigt einen Vergleich von

a) Pherogrammen aus einer der neuesten Publikationen über die papierelektrophoretische Darstellung der Hirnproteine[24].

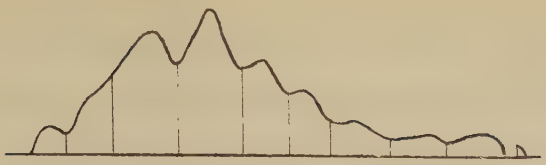
b) eigene durch Papierelektrophorese

c) eigene durch Agar-Gel Elektrophorese gewonnene Kurven.

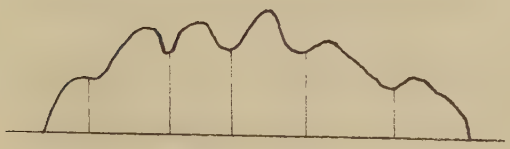
Zu Abb. 12 a)

	Frontal	Parietal	Balken
	1,3	2,2	3,4
V	(0,6-3,4)	(0,8-4,4)	(1,5-7,3)
	4,5	5,3	6,4
A	(3,0-7,7)	(2,0-9,2)	(3,0-11,8)
	9,0	10,3	12,3
α_1	(6,0-17,0)	(4,5-16,0)	(6,2-28,3)
	14,2	15,4	15,7
α_2	(8,0-20,5)	(6,2-20,6)	(9,2-21,5)
	16,6	18,6	21,0
β 1	(11,4-32,9)	(10,2-29,2)	(16,6-32,7)
	22,0	19,3	17,6
β_2	(15,2-29,9)	(10,2-26,8)	(10,6-24,5
	16,3	15,9	14,5
β_3	(7,8-22,7)	(12,1-21,7)	(10,3-18,2)
	16,8	18,3	14,2
γ_1	(9,2-25,1)	(9,1-42,6)	(8,8-29,5
	13,8	14,0	18,9
γ_2	(10,6-17,8)	(9,1-18,8)	
	---	14,6	5,9

Abb. 12b)



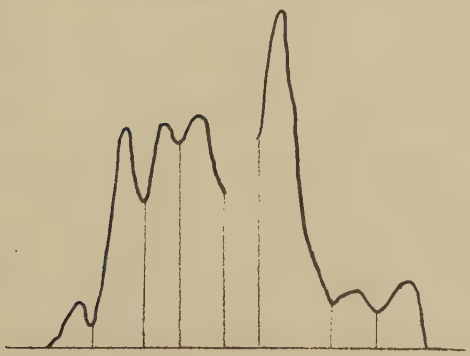
Rinde



Weiße Substanz

Abb.12c)

Rinde



Weiße Substanz

Die Gegenüberstellung zeigt, daß mit der Agar-Gel Elektrophorese wesentlich schärfere Trennungen zu erzielen sind. Die wenig ausgeprägten Maxima und Minima in den Kurven von BOOIJ ermöglichen nur eine sehr ungenaue Darstellung von Gauss'schen Verteilungskurven; auch die von uns wie auch von LOEWENTHAL [12] und anderen Untersuchern verwandte Unterteilung durch Einzeichnen von Senkrechten ist bei wenig profilierten Diagrammen durch eine große Fehlerbreite belastet. Die Verwendung des Agars als Trennmedium erscheint daher weitaus besser als eine elektrophoretische Trennung auf Papier, eine Tatsache, auf die auch G.E.VLADIMIROW bei der Diskussion der Ergebnisse von BOOIJ [24] hinwies.

K. Zusammenfassung.

Es wurden Gehirnpreßsäfte mit der Papier- und der Agar-Gel Elektrophorese untersucht.
Die Agar-Elektrophorese erwies sich der Papierelektrophorese als überlegen. Sie bot folgende Vorzüge und Besonderheiten:

1. Es genügten kleine Substanzmengen zur Untersuchung.
2. Schärfere Trennungen.
3. Die erhaltenen Befunde waren reproduzierbar.
4. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine konnte in relativen Mobilitäten erfaßt werden.
5. Bezüglich der einzelnen Fraktionen:
   Es wurden regelmäßig eine Vorfraktion gefunden, höhere α-Globulinkonzentrationen, niedrige β_2 und γ-Globulinwerte und nur ein γ-Globulin.

Geringe Unterschiede der Proteine kamen in den Pherogrammen zum Ausdruck, aber es war unmöglich, aus einer Vielzahl von Pherogrammen einen bestimmten Hirnbezirk mit Sicherheit zu erkennen. In dieser Beziehung war die elektrophorestische Analyse nur hinweisend. Bei der Papierelektrophorese wurde in Rinde, Stammganglien und Kleinhirn eine Vorfraktion beobachtet, nicht in der weißen Substanz. Bei der Agar-Elektrophorese fanden sich ziemlich regelmäßig im Kleinhirn, in der Hälfte der Fälle in Rinde und Stammganglien

2 Vorfraktionen, in der weißen Substanz in der Mehrzahl der Fälle 1 Vorfraktion. Der Hauptanteil der α_2-Globuline der weißen Substanz wanderte ein wenig langsamer als die α_2-Globuline der übrigen Hirnregionen.

L. Literatur.

1) JACOB J.J.C.: Biochem.Journal (1947) 41 83

2) HENNING N., H.KINZELMEIER, J.DEMLING, M.MANNUSS: Klin.Wschr.(1952) 390

3) KÜCHENMEISTER H.,K.D.VOIGT: Dtsch.Arch.klin.Med. (1954) 201 1

4) ADJUTANTIS G.: Nature (London) Mar.1954 539

5) KAPS G: Archiv f.Psych.u.Nervenheilkunde (Berlin) (1954) 192 115

6) KEUPP, W.: Confinia Neurologica (Basel) (1955) 15 73-83

7) DEMLING J., H.KINZELMEIER und N.HENNING: (1954) Z.exp.Med. 122 416

8) HOFMANN G. und H.SCHINKO: (1956) Klin.Wschr. 34 86

9) ROBERTSON D.M.: (1957) J.of Neurochemistery 1 358

10) ROBUSCHI L. u.G. BENASSI: (1957) Giornale di Psichiatria e di Neuropatologia (Ferrara) 85 183

11) KIYOTA K.: J.of Neurochemistery (1959) 4

12) KARCHER D., M.v.SANDE, u.A.LOEWENTHAL: J.of Neurochemistery June 1959 4.

13) WIEME R.J.: Studies on Agar-Gel Elektrophoresis (1959) ARSCIA UITGAVEN N.N. Brüssel

14) WIELAND Th.und E.FISCHER: Naturwissenschaften (1948) 35 29

15) GRASSMANN W., K.HANNIG u.M.KNEDEL: Dtsch.med.Wschr. (1951) 333

16) BÜCHER Th., D.MATZELT u.D.PETTE: Kli.Wschr. 30 (1952) 325

17) WUNDERLY Ch.: Die Papierelektrophorese Sauerländer H.R. u.Co. Aarau (1954)

18) RABACY M., G.VERRIEST: Ann.Soc.royale Zoolog.Belgique (1958) 88 373

19) URIEL J.: Clin.Chim.Acta (1958) 3 384

20) URIEL J. u. P.GRABAR: Bull.Soc.Chim.biol.; (1956) 38 1253

21) BAUER H.: Vortrag auf dem Neurologenkongreß in Zürich September 1960

22) Zitiert nach H.BAUER: Der Internist, Febr.1961 (2.Heft)

23) ROBERTSON D.M.: J.of Neurochemistery (1060) 5 145

24) BOOIJ J.: in Structure and Function of the cerebral Cortex

Proceedings of the Second International Meeting of Neurobiologists Amsterdam 1959.

M. LEBENSLAUF

Ich, Leonhard Diekmann, wurde als Sohn des Kaufmanns Hermann Diekmann und seiner Ehefrau Hildegard am 4.6.1935 in Lohne geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und von Ostern 1946 an das Gymnasium Antonianum zu Vechta, wo ich Ostern 1955 das Abitur absolvierte. Im Sommersemester 1955 begann ich das Studium der Medizin an der Universität in Bonn. Nach 2 Semestern verließ ich Bonn und immatrikulierte mich an der Philippsuniversität in Marburg/Lahn. Hier legte ich Ende des Sommersemesters 1957 die ärztliche Vorprüfung ab. Meine ersten zwei klinischen Semester studierte ich an der Universität in Wien. Die übrigen 4 klinischen Semester war ich an der Universität in Hamburg immatrikuliert, wo ich am 25.11.1960 die ärztliche Prüfung bestand. Vom 1.1.1961 an bin ich als Medizinalassistent am A.K.St.Georg tätig.